

Thesis Title	Development of Salivary Cholinesterase and Plasma 3-Phenoxybenzoic Acid Assay Methods and Their Application in Pesticide Exposure Assessment	
Author	Ms. Sarunya Thiphom	
Degree	Doctor of Philosophy (Environmental Science)	
Thesis Advisory Committee	Dr. Tippawan Prapamontol	Advisor
	Assoc. Prof. Ampica Mangklabruks, M.D.	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Somporn Chantara	Co-advisor
	Dr. Chaisuree Suphavitai	Co-advisor
	Prof. Dr. Bruce D. Hammock	Co-advisor

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the exposure to currently used non-persistent pesticides. Farmers used the organophosphate (OP) and the synthetic pyrethroids in agricultural and household products. The volunteers in this study composed of 100 farmers (50 females, 50 males) and 100 consumers (50 females, 50 males) that were randomly recruited from the Fang district's agricultural area, Chiang Mai province. There are 2 objectives in this study.

Objective 1 of this study, it was aimed to find alternative biomarkers for OP and carbamate pesticide exposure. Saliva has been suggested as an ideal body fluid besides blood. The Ellman method was modified to measure salivary AChE (SACHe) and salivary BChE (SBChE) activities and then compared with red blood cell AChE (RACHe) and plasma BChE (PBChE) activities in blood (reported method).

In consumers, the medians of the SACHe, SBChE, RACHe and PBChE levels were 4.03 mU/mL, 4.17 mU/mL, 4.18 U/mL and 4.28 U/mL, respectively, while the medians in farmers were 3.94 mU/mL, 4.25 mU/mL, 3.95 U/mL and 4.16 U/mL, respectively. Although SBChE levels are significantly lower (approximately 1000 times) than PBChE levels, SBChE was not influenced by any factors which cause variability in the activity of enzymes. Moreover, amongst consumers who were less exposed to pesticides, there was no variability in low level detection of SBChE because the present study found a correlation ($r = 0.232$, $P = 0.020$) between the activity of SBChE and PBChE only in consumers.

The modified methods in the present study had sufficient sensitivity with low within day coefficients of variation (%CV) by the intra-assay, and between-day %CV by the inter-assay for all 6 enzymes. However, a more sensitive method should be developed in a further study to measure the relatively low activities of SACHe and SBChE among ChE inhibited farmers.

Objective 2, immunoassays were developed to detect 3-PBA in plasma (including the adducted form) and urine. The ELISA was very sensitive having an IC_{50} value of 26.7 and 15.3 ng/mL, a limit of quantitation (LOQ) of 5 and 2.5 ng/mL and a limit of detection (LOD) of 1.08 and 1.94 ng/mL for plasma and urine, respectively. These

methods had low (< 5%) intra- and inter-assay coefficients of variation. The extraction technique satisfactorily eliminated the matrix effect from plasma and urine before ELISA analysis, yielding good recoveries (85.9-99.4% and 87.3-98.0%, respectively). For the volunteer study, the detection rate for plasma 3-PBA was 24% in consumers and 42% in farmers, but the median and range values were similar (median 5.87 ng/mL, range 5.16-8.44 ng/mL in consumers and 6.27 ng/mL, range 4.29-9.57 ng/mL in farmers). The rate of detection in the urine was similar (76% and 69%, in consumers and in farmers), yet the median concentration was significantly higher in farmers (8.86 µg/g creatinine in consumers vs 16.1 µg/g creatinine in farmers) and the range also much wider in farmers (1.62-80.5 µg/g creatinine in consumers and 0.80-256.2 µg/g creatinine in farmers).

Interestingly, there was no correlation between plasma 3-PBA and urinary 3-PBA concentrations in the study population. However, the farmer population likely had more recent acute exposures that would lead to transient high urinary 3-PBA concentrations. Also, metabolism and urinary elimination of pyrethroids varies by individual. Further studies are necessary to determine the precise reasons for the difference.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การพัฒนาฯ วิธีตรวจวัดโคตินเอสเตอเรสในน้ำลายและ
3-ฟีนอกซีเบนโซอิกแอซิดในพลาสมา และการประยุกต์ใน
การประเมินการสัมผัสสารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์

ผู้เขียน

นางสาวสรัญญา ถีป้อม

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. ทิพวรรณ ประภามณฑล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.พญ. อัมพิกา มังคะพลฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. สมพร จันทระ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ฉายสุรีย์ ศุภวิไล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Bruce D. Hammock	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จุดประสงค์งานวิจัยนี้ คือ เพื่อประเมินการสัมผัสสารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ ซึ่งไม่มีฤทธิ์ตกค้างยาวนานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เกษตรกรใช้สารฯ กลุ่มออร์การโนฟอสเฟตและกลุ่มไพรีทรอยด์ทั้งในการเกษตรและครัวเรือน อาสาสมัครในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยผู้บริโภคร 100 คน (เพศหญิง 50 คน เพศชาย 50 คน) และเกษตรกร 100 คน (เพศหญิง 50 คน เพศชาย 50 คน) ซึ่งได้รับการคัดเลือกแบบสุ่มจากพื้นที่เกษตรกรรมที่อาศัยอยู่ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

วัตถุประสงค์แรกของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อค้นหาดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ สำหรับการประเมินการสัมผัสสารฯ กลุ่มออร์การโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต โดยน้ำลายเป็นของเหลวที่ถูกแนะนำให้ใช้นอกจากเลือด งานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้วิธีของ เอลแมน ในการวัดการทำงานของ ซีเอสที ในน้ำลายของอาสาสมัครเปรียบเทียบกับการทำงานของ ซีเอสที ในเลือด ในกลุ่มผู้บริโภคร พบค่ากลางระดับการทำงานของเอนไซม์ เอซีเอชอีในน้ำลาย บีซีเอชอีในน้ำลาย เอซีเอชอีในเม็ดเลือดแดง และ บีซีเอชอีในพลาสมา คือ 4.03 มิลิยูนิตต่อไมโครลิตร 4.17 มิลิยูนิตต่อไมโครลิตร 4.18 ยูนิตต่อไมโครลิตร และ 4.28 ยูนิตต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ในกลุ่มเกษตรกร พบว่าค่าเท่ากับ 3.94 มิลิยูนิตต่อไมโครลิตร 4.25 มิลิยูนิตต่อไมโครลิตร 3.95 ยูนิตต่อไมโครลิตรและ 4.16 ยูนิตต่อไมโครลิตร ตามลำดับ แม้ว่าระดับเอนไซม์ บีซีเอชอีในน้ำลายมีค่าต่ำกว่าในเลือดประมาณ 1000 เท่า แต่เอนไซม์ในน้ำลายนั้นไม่มีปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ ในกลุ่มผู้บริโภครผู้ที่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีใน

ปริมาณน้อยกว่าเกษตรกรรมนั้น ก็ไม่พบความแปรปรวนเมื่อวัดเอนไซม์ที่มีปริมาณน้อยมากในน้ำลาย เพราะว่าในงานวิจัยนี้พบความสัมพันธ์ (อาร์ = 0.229, พี = 0.022) ระหว่างค่าการทำงานของเอนไซม์บีซีเอซีในน้ำลายและเลือด

วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกพัฒนาให้มีค่าความไวมากพอโดยดูจากค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และการวิเคราะห์ทั้งหมด ในทุกชนิดของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ควรมีการพัฒนาวิธีให้มีความไวในการวัดมากยิ่งขึ้นในงานวิจัยครั้งต่อไป เพื่อที่จะสามารถวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ในน้ำลายที่มีค่าค่อนข้างต่ำมากในกลุ่มของเกษตรกร

วัตถุประสงค์ที่ 2 คือ อิมมูโนแอสเซย์ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการวัด 3-ฟีนอกซีเบนโซอิกแอซิด (3-พีบีเอ) ในพลาสมา (รวมถึงที่อยู่ในรูปแอดคัก) และในปัสสาวะ วิธีอิลูซ่ามีความไวมาก ซึ่งมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งจาก 3-พีบีเอ เท่ากับ 26.7 และ 15.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ค่าแอลโอคิว เท่ากับ 5 และ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และค่าแอลโอดี เท่ากับ 1.08 และ 1.94 ตามลำดับ วิธีในงานวิจัยนี้มีค่าความแปรปรวนจากการวัดค่อนข้างต่ำ (< 5%) โดยดูจากค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และการวิเคราะห์ทั้งหมด วิธีในงานวิจัยนี้สามารถกำจัดสารตัวอื่นออกจากพลาสมาและปัสสาวะได้เกือบทั้งหมดก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยอิลูซ่า โดยให้ค่าการกลับคืนหลังจากผ่านกระบวนการเท่ากับร้อยละ 88-98 และ 87- 98 ตามลำดับ ในกลุ่มอาสาสมัครนั้น เปอร์เซ็นต์การพบ 3-พีบีเอ ในพลาสมา คือ ร้อยละ 24 ในกลุ่มผู้บริโภคร และร้อยละ 42 ในกลุ่มเกษตรกร แต่ค่ากลางและช่วงค่าความเข้มข้นของสารเกือบเท่ากัน ในสองกลุ่มนี้ (ในกลุ่มผู้บริโภคร มีค่ากลาง เท่ากับ 5.87 และช่วงค่าความเข้มข้น เท่ากับ 5.16-8.44 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และในกลุ่มเกษตรกร มีค่ากลาง เท่ากับ 6.31 และช่วงค่าความเข้มข้น เท่ากับ 4.29-9.57 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และเปอร์เซ็นต์การพบสารในปัสสาวะนั้นก็เกือบเท่ากันทั้งสองกลุ่ม (ร้อยละ 76 ในกลุ่มผู้บริโภครและ ร้อยละ 69 ในกลุ่มเกษตรกร) ค่ากลางของความเข้มข้นในกลุ่มเกษตรกรนั้นมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้บริโภคร (มีค่าเท่ากับ 8.82 และ 16.1 ไมโครกรัมต่อกรัมต่อค่าครีเอตินิน และมีค่าช่วงความเข้มข้นในกลุ่มเกษตรกรสูงกว่าผู้บริโภครมาก (มีค่าเท่ากับ 1.62-80.5 ไมโครกรัมต่อกรัมต่อค่าครีเอตินิน ในกลุ่มผู้บริโภคร และ 0.80-256.2 ไมโครกรัมต่อกรัมต่อค่าครีเอตินิน ในกลุ่มเกษตรกร)

อีกสิ่งที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้ คือ ไม่พบความค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 3-พีบีเอ ในพลาสมาและปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม กลุ่มเกษตรกรดูเหมือนว่ามีการสัมผัสสารฯ มากกว่ากลุ่มผู้บริโภคร ซึ่งทำให้พบความเข้มข้นของ 3-พีบีเอสูงในปัสสาวะ นอกจากนี้ อัตราเมแทบอลิซึมและการกำจัดสารเคมีฯ ออกจากร่างกายนั้นจะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไป นั้นจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์เหตุผลที่แน่นอนสำหรับสาเหตุของความแตกต่างนี้